

포부자추출물의 갑상선기능저하증 흰쥐모델에서의 한열조절작용에 의한 개선효능 연구

황민섭^{1#}, 황지혜², 강석용¹, 강안나¹, 노효선¹, 박용기^{1,2*}

1 : 동국대학교 한의과대학, 2 : 동국대학교 한방신약개발센터

Effects study of Aconiti Lateralis Radix Preparata extract on the regulation of heat and cold in PTU-induced hypothyroidism rats

Min Sub Hwang^{1#}, Ji Hye Hwang², Seok Yong Kang¹, An Na Kang¹,
Hyo Sun Roh¹, Yong-Ki Park^{1,2*}

1 : College of Korean Medicine, Dongguk University, 2 : Korean Medicine R&D Center, Dongguk University

ABSTRACT

Objective : To suggest a scientific evidence of Aconitum carmichaeli Debx. (Aconiti Lateralis Radix Preparata: ALRP) as one of cooling and heating medicines on the regulation of body temperature, we investigated the effects of ALRP water extract on hypothyroidism.

Methods : Hypothyroidism was induced by intradermal injection with PTU for 4 weeks in SD rats, ALRP extract or L-thyroxine as a control drug was orally administrated for 2 weeks with PTU injection in rats. The physiological and serological parameters were measured in rats. The histological change of thyroid tissues was observed by H&E staining, and also the expression of thermo-regulating proteins was determined by Western blot in dorsal root ganglia and brain tissues of rats.

Results : The administration of ALRP extract in PTU-induced hypothyroidism rats was significantly increased body temperature, but did not changes on body weight, food and water intake. ALRP extract did not effect on the levels of TSH and T4 in the hypothyroidism rats. ALRP extract significantly decreased the levels of GPT, glucose, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, and total cholesterol in the hypothyroidism rats. In histological observation, the enlarged epithelium and atrophic follicles with higher concentration of follicular cells on hypothyroidism were improved by ALRP extract. In addition, ALRP extract increased the expression of TRPV1 and TRPM8 ion channel proteins in hypothyroidism rats.

Conclusion : These results indicate that ALRP extract can improve PTU-induced hypothyroidism through regulation of body temperature and lipid accumulation. The action mechanism of ALRP extract is related with body temperature control by thermoregulation with TRP ion channels.

Key words : Aconitum carmichaeli Debx., Aconiti Lateralis Radix Preparata, PTU, hypothyroidism, TRPV1, TRPM8

I. 서 론

갑상선기능저하증(hypothyroidism)은 갑상선에서 갑상선

호르몬의 생산이 결핍되어 발생하는 질환으로 갑상선 조직의
소실로 호르몬 합성이 불가능한 경우와 호르몬 조절 상위 중
추인 시상하부 또는 뇌하수체 기능에 이상이 생겨서 갑상선

*Corresponding author : Yong-Ki Park, College of Korean Medicine, Dongguk University.
· Tel : +82-54-770-2661 · Fax : +82-54-770-2661 · E-mail : yongki@dongguk.ac.kr
#First author : Min Sub Hwang, College of Korean Medicine, Dongguk University.
· Tel : +82-54-770-1266 · E-mail : acup99@hanmail.net
· Received : 11 October 2016 · Revised : 4 November 2016 · Accepted : 16 November 2016

호르몬 합성 단계에서 장애가 생기는 경우에 발생한다¹⁾. 갑상선 기능저하증의 치료는 주로 Levothyroxine(LT4)을 넣어 갑상선호르몬을 보충하는 방법을 사용하고 있으나²⁾, 약물을 장기간 복용해야 하는 불편함이 있고, 허혈성 심질환의 발생, 갑상선 호르몬 요구량의 변화 및 LT4 보충에도 불구하고 임상증상이 개선되지 않는 등 여러 가지 문제점이 발생하고 있다^{3,4)}. 따라서 기존 치료제의 단점을 극복하면서 치료의 효율을 높일 수 있는 새로운 치료방법 및 제제 개발 연구가 필요한 실정이다.

한의학에서는 한의약의 약물학적 성질을 음양(陰陽)에 입각한 사기(四氣)로 분류하여 한(寒), 열(熱), 온(溫), 량(涼)으로 구분하고, 병증의 진단과 치료의 기준 또한 한열변증(寒熱辨證)을 이용하여 한증(寒證)과 열증(熱證)으로 나누어 약물의 한열온량 약성(藥性)을 이용해서 치료한다. 한의학적으로 갑상선기능이상증은 한열의 불균형으로 진단하여 한열의 균형을 조절하는 것이 치료의 원칙이 될 수 있다고 본다⁵⁾. 갑상선기능저하증은 갑상선호르몬 부족으로 나타나며, 갑상선호르몬은 에너지 호르몬으로 열에너지의 원천이 되는데 결핍 정도에 따라 임상 증상이 다르게 나타나며, 태아 및 신생아의 뇌와 골격의 성장 및 발육장애, 열 발생 저하로 체온하강, 조직 내 대사율 감소로 인한 이화작용 저하에 의해 조직 내 대사산물의 축적이 유발되고 모든 장기의 기능저하 현상이 주로 나타나게 된다¹⁾. 따라서 현대 질병인 갑상선기능저하증은 한의학에서의 한열 개념으로 해석할 수 있으며 음양 중에 음, 한열 중에 한에 해당한다고 할 수 있다. 한의학에서의 치료는 한열의 불균형을 회복시키는 것으로 한의학적 병태생리로서 비신양허 또는 상한 소음병의 병태와 유사하여 온리약 중심의 처방을 사용하게 된다.

부자(附子)는 미나리아재비과(Ranunculaceae)에 속한 다년생 초본인 오두(烏頭, *Aconitum carmichaeli* Debx.)의 자근(子根, *Aconiti Lateralis Radix Preparata*: ALRP)를 가공한 것으로 본초학적으로 부자의 기미(氣味)는 열(熱), 감신(甘辛)하며 유독(有毒)하고, 원양(元陽)을 보조하는 주약(主藥)으로 능승능강(能升能降)하며 능내달능외산(能內達能外散)한 성질을 가진 양중지양(陽中之陽)의 본초로 일체(一切)의 침한고냉지질(沈寒痼冷之疾)을 치료하는데 주로 이용된다. 부자는 가공하면(炮製) 알칼로이드(alkaloid)의 양과 독성이 대체로 감소되기 때문에 임상에서는 포부자(炮附子)를 많이 사용한다⁶⁾. 부자의 효능에 대한 실험연구로는 강심작용, 항부정맥 작용, 혈류량증가, 혈압상승 효과가 보고된 바 있고, 신경계에 작용하여 항한랭, 진통, 진정, 국소마취작용 및 항염, 면역기능 증강작용이 있다고 보고되었다^{7,8)}. 포부자에 관한 연구는 대부분 강심효과나 강심성분의 작용에 관한 것^{9,10)}과 복용 후 발생하는 중독증 및 부작용에 대한 보고가 있다^{10,11)}.

현재 부자의 갑상선기능이상증에 대한 효능 보고는 거의 없으며, 한열이론과 관련하여 치료기전을 해석한 연구는 이루어진 바 없다. 따라서 본 연구에서는 대표적인 열성약 중 하나인 포부자의 갑상선기능저하증에서의 한열조절작용을 통한 개선 효과를 조사하였으며 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

본 실험에 사용된 포부자(*Aconiti Lateralis Radix Preparata*: ALRP)는 광명당 제약(울산, 한국)으로부터 표준약재를 구입하여 추출물 제조에 사용하였다.

2) 시약 및 기기

실험에 사용된 시약으로는 6-Propyl-2-thiouracil(PTU: Sigma-Aldrich, CA, USA), L-thyroxine (Sigma-Aldrich), Hematoxylin & eosin(H&E) solution(Seoulin Biosciences Co., Seoul, Korea), thyroid stimulating hormone(TSH) enzyme-linked immunoassay(ELISA) kit(Cusabio, China), T3 ELISA kit(Cusabio, China), T4 ELISA kit(Cusabio, China)이며, 실험에 사용된 기기로는 현미경(LEICA, Wetzlar, Germany), 자동혈액분석기(FDC7000i, Fujifilm Co., Japan), ELISA reader(ASYS, Austria), 추출기(Daihan scientific, Korea), 회전식감압농축기(Eyela Co., Ltd, Japan), 동결건조기(Ilshin Lab Co., Ltd, Korea) 등을 사용하였다.

3) 실험동물

본 실험에 사용한 실험동물은 5주령 Sprague-Dawley (SD)계 수컷 Rat(170-190 g)을 (주)오리엔트바이오 (경기도, 한국)로부터 공급받아 1주일 동안 순화시킨 후 동물모델 제작에 사용하였다. 실험기간동안 일정량의 고형사료(200 g)와 정수된 물(500 ml)을 섭취시켰으며, 명암은 12시간(Day light 08:00~20:00) 주기로, 23±2℃의 실내온도와 50±10%의 습도를 유지하여 실험종료까지 일정한 사육조건을 유지시켰다. 모든 실험동물은 동물보호법 13조 및 동국대학교 동물실험 윤리위원회 심의(IACUC-2016-006)에 따라 관리하였다.

2. 방법

1) 포부자추출물 제조

포부자추출물은 포부자 100 g을 물로 95℃에서 3시간 추출하였으며, 3겹 거어즈 및 왓만 거름종이(Whatman No. 1)로 거른 후 회전식 감압농축기를 이용하여 농축하였다. 이를 냉동시킨 후 동결건조기로 건조하였으며 이때 수율은 21.7%였다. 건조된 포부자추출물은 미세하게 마쇄한 후 일정 용기에 담아 냉동 보관하였으며, 실험직전 생리식염수에 일정 농도로 완전 용해시켜 시험약물로 사용하였다.

2) 갑상선기능저하증 동물모델 제작

갑상선기능저하증 동물모델 제작을 위해 10 mg/kg(body weight) 용량의 PTU를 0.3 ml 생리식염수에 용해한 후 매일 1회씩 4주 동안 등(dorsal) 쪽 경부에 피하주사함으로써 갑상선기능저하증을 유발하였다(그림 1). 한편 정상 대조군은 PTU 대신 같은 용량의 생리식염수를 경부피하에 주사하여 동일한 조건을 유지하였다. 2주간 PTU를 주사한 후 3주가 시작되는 시점부터 실험종료까지 2주 동안 포부자 300 mg/kg을 경구 투여 하였다. 양성 대조약물로 L-thyroxine(0.5 mg/kg)를

복강 주사하였으며, 정상군과 갑상선기능저하증 유발군은 동일 양의 생리식염수를 경구 투여하였다.

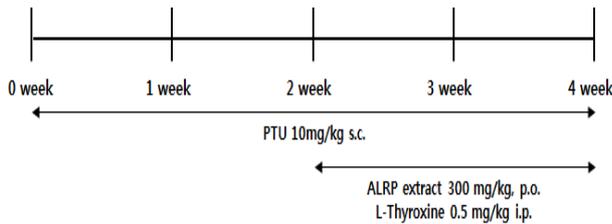


Fig. 1. Preparation of PTU-induced hypothyroidism in rats

3) 생리학적 변화 평가

실험을 수행하는 4주 동안 매주 1회 체중과 섭취량, 음수량 및 직장체온을 측정하였다. 섭취량은 매주 1회 200 g의 고형 사료를 제공한 후 다음 측정 시 잔여량을 측정하여 평가하였고, 음수량 역시 매주 1회 500 ml의 정수된 물을 제공한 후 1주일 후 잔여량을 측정하여 평가하였다. 또한 직장체온은 실험자가 실험동물을 고정된 후 직장체온계를 삽입하여 5초간 고정함으로써 체온 변화가 없는 수치를 측정하였다.

4) 혈액학적 변화 평가

실험 종료 후 모든 실험동물을 희생시키고 복대정맥에서 혈액을 채취하였으며, 혈청을 분리하여 -80℃에 보관하였다. 혈청 내 TSH, T3, T4의 농도를 각 호르몬에 대한 ELISA kit를 이용하여 측정하였다. 즉, 96-well plate에 표준용액과 혈청을 100 µl씩 넣고 conjugate를 넣은 후 37℃에서 1시간 반응시켰다. 이를 wash buffer를 이용하여 3회 세척한 후 HRP-avidin을 넣어 37℃에서 30분간 반응시키고 3회 wash하였으며, 여기에 substrate를 넣어 37℃에서 15분 반응시켰다. 반응정지액을 넣고 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하였으며, 혈청 내 각 호르몬의 농도는 키트 내 표준용액을 사용하여 환산하였다. 한편, 자동혈액분석기를 이용하여 혈청 내 GOT, GPT, total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, triglyceride 및 glucose의 농도를 측정하였다.

5) 조직학적 변화 평가

실험 종료 후 모든 실험동물을 희생시키고 갑상선 조직을 적출한 후 4% paraformaldehyde 용액에 24시간 담가 고정하고, 파라핀 포매 과정 후 microtome을 이용하여 2 µm 두께로 절편하여 조직슬라이드를 제작하였다. 조직슬라이드의 H&E 염색을 위하여 hematoxylin으로 5분간 염색한 후 eosin으로 2~3분간 염색한 후 탈수과정을 거쳐 mounting한 후 광학현미경으로 조직학적 변화를 관찰하였다.

6) Western blot

실험 종료 후 모든 실험동물을 희생시키고 척수후근신경절(dorsal ganglia, DRG)과 뇌(brain) 조직을 적출하여 말초조직의 온도감수성일시적전위통로(transient receptor protein, TRP)인 TRPV1과 TRPM8의 발현 변화를 확인하기 위해 Western blot을 수행하였다. 즉, 각 조직에 RIPA buffer를 넣고 마쇄기(homogenizer)를 이용하여 조직액을 분리한 후

단백질의 양을 Bradford protein assay 용액으로 측정하였다. 총 30 µg 단백질을 SDS-PAGE 방법으로 분리한 후 nitrocellulose membrane에 transfer하였다. Membrane은 5% Skim milk 용액을 이용하여 실온에서 1시간 blocking하고, TRPV1과 TRPM8에 대한 1차 항체 넣고 4℃에서 하룻밤 반응시켰다. 이를 TBST buffer(Tris-buffered saline with 0.1% Tween 20, pH 7.5)로 5회 세척한 후 HRP-conjugated 2차 항체와 실온에서 1시간 반응시켰다. 이를 다시 TBST buffer로 5회 세척한 후 X-ray film에 감광시켜 밴드 유무를 관찰하였다. 각 밴드는 Image J program(NIH, USA)을 이용하여 density를 측정하고 β-actin 발현에 대한 상대적 비율로 계산하여 3회 반복실험에 대한 결과를 그래프(histogram)로 나타내었다.

7) 통계학적 검정

모든 실험결과는 최소 3회 반복실험에 대한 평균과 표준편차(mean ± SD)로 나타내었으며, 통계학적 유의성은 GraphPad Prism 5.0 분석프로그램(GraphPad Software, CA, USA)의 one-way ANOVA와 Tukey's test를 이용하여 검정하여 p값이 0.05 이하인 경우를 유의성 있는 것으로 판정하였다.

III. 결 과

1. 갑상선기능저하에 따른 생리학적 변화에 대한 효과

1) 체중, 식이섭취량 및 수분섭취량 변화에 대한 효과

체중 변화에 대한 효과를 확인한 결과 PTU로 갑상선기능저하증 유발 기간 동안 매주 1회 체중의 변화를 측정한 결과, 4주째 정상군(normal)에 비해 갑상선기능저하증 유발 대조군(control)에서 체중감소가 나타났으며, 포부자추출물(ALRP 300 mg/mg)의 투여는 체중감소에 영향을 주지 않는 것으로 나타났다(그림 2A). 그러나 대조약물인 L-thyroxine(0.5 mg/mg) 투여군에서는 대조군에 비해 체중이 증가한 것으로 나타났다. 식이섭취량(그림 2B)과 음수량(그림 2C)에서는 정상군에 비해 대조군에서 감소하였고 포부자추출물의 투여는 식이섭취량과 음수량에 영향을 주지 않았다. 반면 대조약물군에서는 식이섭취량이 정상군과 유사하였지만 수분섭취량은 증가한 것으로 나타났다. 따라서 포부자추출물은 갑상선기능저하증 유발에 따른 체중감소와 섭취량 및 음수량의 감소에는 영향을 주지 못하는 것으로 확인되었다.

2) 체온변화에 대한 효과

체온 변화에 대한 포부자추출물의 조절 효과를 확인하기 위해 매주 1회 직장 체온의 변화를 측정하였다. 4주째 정상군(normal)에 비해 갑상선기능저하증 유발 대조군(control)에서 체온감소 현상이 관찰되었으며, 포부자추출물(ALRP 300 mg/mg)을 2주 간 투여하였을 때 대조군에 비해 체온이 증가하는 것으로 나타났다(그림 3). 또한 대조약물 투여군에서도 대조군에 비해 증가하는 것으로 나타났다. 따라서 포부자추출물은

갑상선기능저하증 유발에 따른 체온저하를 개선시켜줄 수 있는 것으로 나타났다.

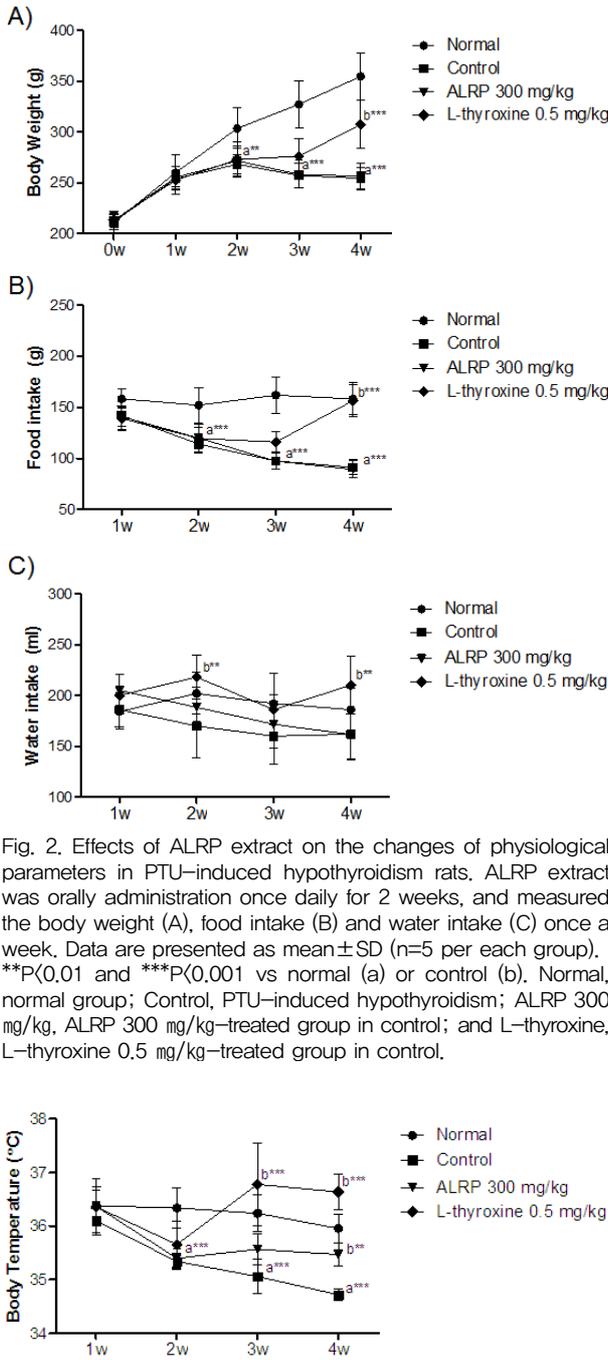


Fig. 2. Effects of ALRP extract on the changes of physiological parameters in PTU-induced hypothyroidism rats. ALRP extract was orally administration once daily for 2 weeks, and measured the body weight (A), food intake (B) and water intake (C) once a week. Data are presented as mean±SD (n=5 per each group). **P<0.01 and ***P<0.001 vs normal (a) or control (b). Normal, normal group; Control, PTU-induced hypothyroidism; ALRP 300 mg/kg, ALRP 300 mg/kg-treated group in control; and L-thyroxine, L-thyroxine 0.5 mg/kg-treated group in control.

Fig. 3. Effects of ALRP extract on the changes of body temperature in PTU-induced hypothyroidism rats. ALRP extract was orally administration once daily for 2 weeks, and measured the body temperature by rectal thermometer. Data are presented as mean±SD (n=5 per each group) **P<0.01 and ***P<0.001 vs normal (a) or control (b). Normal, normal group; Control, PTU-induced hypothyroidism; ALRP 300 mg/kg, ALRP 300 mg/kg-treated group in control; and L-thyroxine, L-thyroxine 0.5 mg/kg-treated group in control.

3) 갑상선 호르몬 분비 변화에 대한 효과

갑상선호르몬 분비 변화에 대한 포부자추출물의 조절효과를 확인하기 위해 혈청 내 TSH, T3, T4의 농도를 ELISA 방법

으로 측정하였다. 그 결과 TSH는 정상군(normal)에 비해 갑상선기능저하증 유발 대조군(control)에서 유의적으로 증가되었고, 포부자추출물(ALRP 300 mg/mg) 투여 시 대조군과 유사한 수준이었으며, 대조약물인 L-thyroxine 투여군에서는 정상군과 유사한 수준으로 나타났다(그림 4A). T4 분비는 정상군에 비해 대조군에서 유의적으로 감소하였고, 포부자추출물은 대조군과 유사하게 측정되었고, 대조약물 투여군은 대조군에 비해 유의적으로 증가하는 것으로 나타났다(그림 4B). 따라서 포부자추출물은 갑상선기능저하증 유발에 따른 TSH와 T4 호르몬 분비 변화에는 영향을 주지 않는 것으로 나타났다.

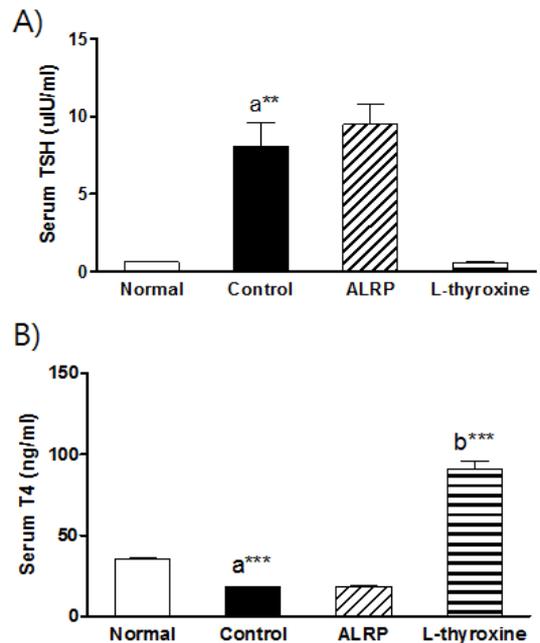


Fig. 4. Effects of ALRP extract on the thyroid hormone levels in PTU-induced hypothyroidism rats. ALRP extract was orally administration once daily for 2 weeks, and measured the levels of TSH (A) and T4 (B) in the sera of rats by ELISA, respectively. Data are presented as mean±SD (n=5 per each group). *P<0.05, **P<0.01 and ***P<0.001 vs normal (a) or control (b). Normal, normal group; Control, PTU-induced hypothyroidism; ALRP, ALRP 300 mg/kg-treated group in control; and L-thyroxine, L-thyroxine 0.5 mg/kg-treated group in control.

4) 혈액학적 변화에 대한 효과

갑상선기능저하증 유발에 따른 혈액학적 특성 변화에 대한 포부자추출물의 조절효과를 확인하기 위해 혈청 내 GOT, GPT, glucose, triglyceride, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, total cholesterol의 농도를 혈액자동분석기를 이용하여 측정하였다. 그 결과 정상군에 비해 대조군에서 GPT, glucose, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol 및 total cholesterol의 분비가 증가하였으며, triglyceride의 분비는 감소하였다(그림 6). 포부자추출물(ALRP 300 mg/mg)의 투여는 대조군에 비해 GPT, glucose, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol의 분비를 감소시켰으며, 대조약물인 L-thyroxine의 투여에서도 포부자추출물 투여군과 유사한 감소효과를 나타내었다. 따라서 갑상선기능저하증에서 포부자추출물의 투여는 대사저하에 따른 혈당과 지질대사산물의 전반적 증가 현상을 조절할 수 있는 것으로 나타났다.

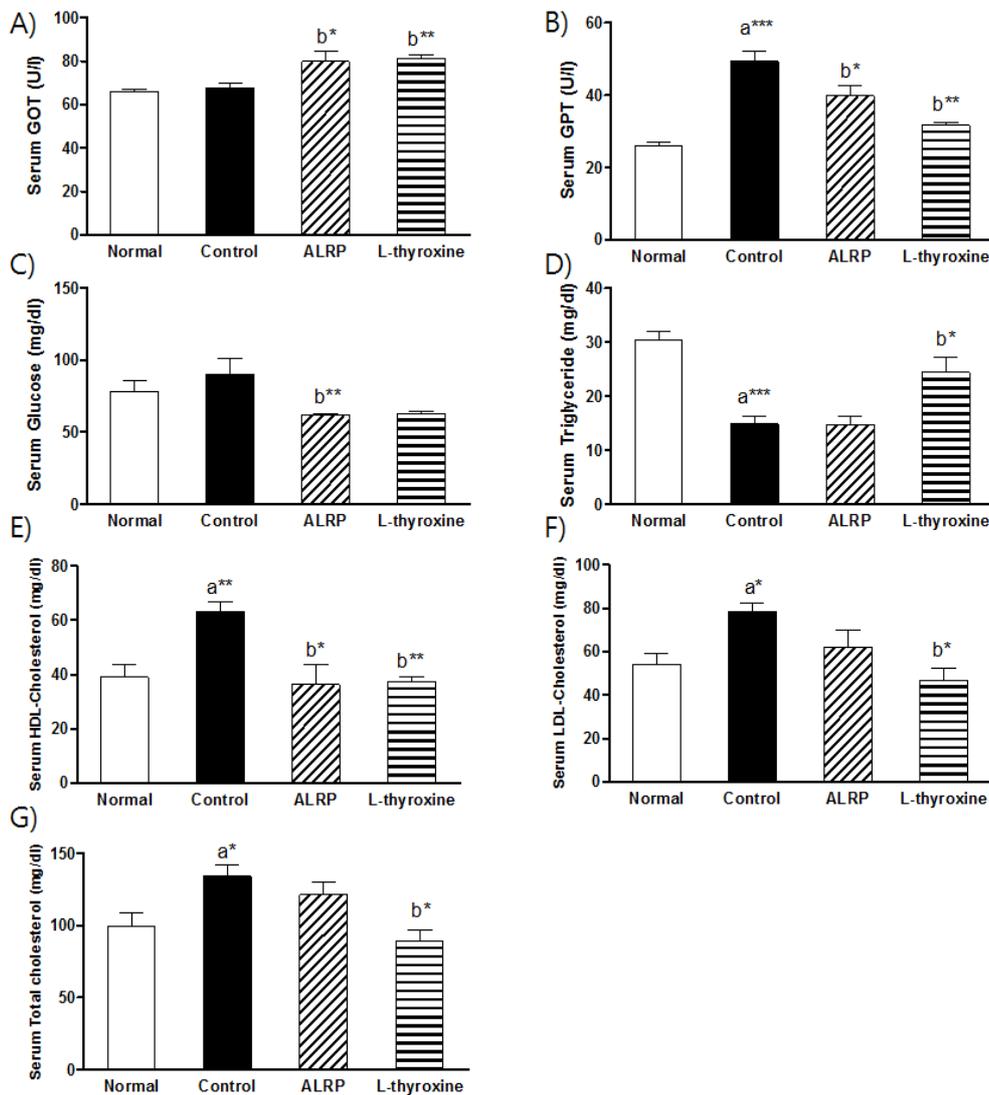


Fig. 6. Effects of ALRP extract on the levels of serological parameters in PTU-induced hypothyroidism rats. ALRP extract was orally administration once daily for 2 weeks, and measured the levels of GOT (A), GPT (B), glucose (C), triglyceride (D), HDL-cholesterol (E), LDL-cholesterol (F) and total cholesterol (G) in the sera of rats by automatic blood biochemical analyzer. Data are presented as mean±SD (n=3 per each group).

*P<0,05 and **P<0,01 vs normal (a) or control (b). Normal, normal group; Control, PTU-induced hypothyroidism; ALRP, ALRP 300 mg/kg-treated group in control; and L-thyroxine, L-thyroxine 0.5 mg/kg-treated group in control.

5) 갑상선 조직 변화에 대한 효과

갑상선 조직의 병리적 변화에 대한 포부자추출물의 개선 효과를 확인하기 위해 조직 슬라이드를 제작하여 H&E 염색 하였다. 정상군에서는 여포의 직경이 넓고 여포 외벽의 변화가 없는 반면, 대조군에서는 정상군에 비하여 여포 직경이 많이 감소하였고, 여포 외벽에서의 여포세포의 수적증가로 인하여 외벽이 두꺼워졌고, 여포의 모양도 손상된 것을 확인할 수가 있었다. 한편, 이러한 갑상선 조직의 이상소견이 포부자추출물 투여군에서는 대조군에 비하여 여포의 직경이 넓어짐과 더불어 여포 외벽의 비후된 정도도 많이 개선된 것을 확인할 수 있었다. 또한 대조약물 투여군에서는 여포의 직경과 외벽이 정상군에 가깝게 개선된 것을 확인할 수 있었다(그림 6). 따라서 포부자추출물은 갑상선 조직에서의 여포 직경 및 외벽 비후에 대한 개선효과를 통하여 갑상선에서 분비되는 호르몬의 조절을 통한 체내 호르몬 이상 징후를 개선할 것으로 사료된다.

6) 체온조절단백질 발현에 대한 효과

말초조직의 온도를 조절하는 온도감수성일시적전위통로 (TRP)에 대한 조절효과를 확인하기 위해 척수후근신경절(dorsal ganglia, DRG)과 뇌(brain) 조직으로부터 TRPV1과 TRPM8의 발현을 Western blot 방법으로 측정하였다(그림 7). 그 결과 TRPV1의 발현은 DRG와 뇌 조직에서 모두 정상군에 비해 갑상선저하증 유발 대조군에서 감소하였으며, 포부자추출물과 L-thyroxine 처리군에서 증가하였다(그림 7). 또한 TRPM8의 발현은 정상군에 비해 대조군에서 증가하였고 이는 포부자추출물과 L-thyroxine 처리군에서 감소하였다. 따라서 포부자추출물은 갑상선기능저하증 유발에 따른 체온감소에서 체온증가조절 이온단백질인 TRPV1의 발현을 증가시키고, 체온감소조절 이온단백질인 TRPM8의 발현을 감소시킴으로써 체온조절효과를 나타내는 것으로 확인되었다.

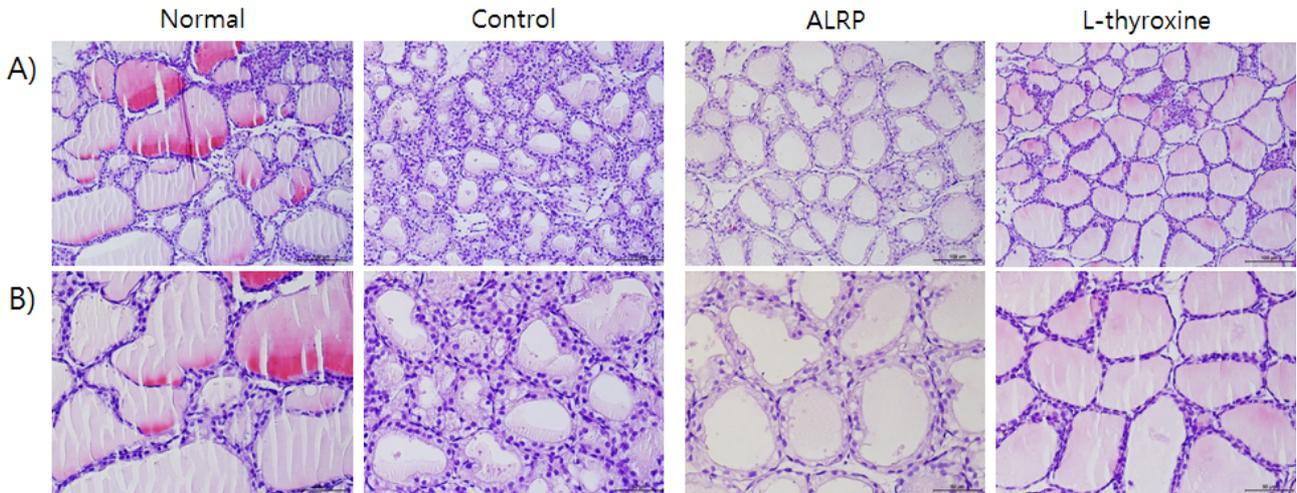


Fig. 6. Effects of ALRP extract on the histological changes of thyroid tissues in PTU-induced hypothyroidism rats. ALRP extract was orally administration once daily for 2 weeks, and isolated thyroid glands from the rats. Thyroid tissues were prepared paraffin-formatted slide, and stained with H&E dye. Morphological changes were observed by microscope x200 (A), and x400 (B) original magnification. Normal, normal group; Control, PTU-induced hypothyroidism; ALRP, ALRP 300 mg/kg-treated group in control; and L-thyroxine, L-thyroxine 0.5 mg/kg-treated group in control.

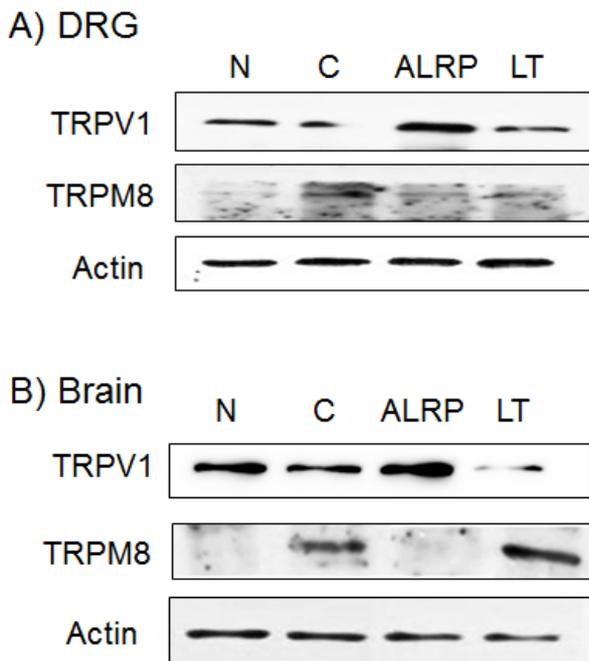


Fig. 7. Effects of ALRP extract on the expression of TRPV1 and TRPM8 in DRG and brain tissues of PTU-induced hypothyroidism rats. ALRP extract was orally administration once daily for 2 weeks, and isolated DRG (A) and brain (B) tissues from the rats. TRPV1 and TRPM8 was determined by Western blot, respectively. N, normal group; C, PTU-induced hypothyroidism; ALRP, ALRP 300 mg/kg-treated group in control; and LT, L-thyroxine 0.5 mg/kg-treated group in control.

IV. 고찰

갑상선기능저하증(hypothyroidism)은 갑상선에서 갑상선 호르몬 생산이 결핍되어 발생하는 병증을 통칭하는 질환이며, 갑상선호르몬 결핍은 인체 내 각종 대사 작용에 다양한 영향을 미치게 된다¹⁾. 갑상선호르몬이 부족하면 심장에 점액수종이 생겨 수축력 감소, 심비대, 심낭삼출, 맥박수 감소, 심박출

량 감소 등을 초래하고, 위에서 위산분비와 위 운동성 저하로 인한 장내 진행 장애와 무배란, 월경불순, 불임 등의 증상 및 대사 이상으로 total cholesterol, LDL-cholesterol 증가 및 혈당증가와 인슐린 저항성 등을 유발하게 된다^{12,13)}. 갑상선기능저하증의 주요 증상은 한불내성, 비만, 발한감소, 거친 피부 등이며 기타 식욕감소, 무기력, 우울, 관절통, 근육통, 기억력감소, 변비, 시력감소, 거친 목소리 등 비 특이적 증상을 동반하게 된다^{13,14)}. 갑상선기능저하증의 치료 목표는 임상증상의 진행을 막고, 정상적 수준의 호르몬(TSH, T4) 수준을 유지시켜 정상적대사과정이 진행될 수 있도록 하는 것이다. 현재 서양 의학적 치료는 일정양의 Levothyroxine을 매일 복용하는 것과¹²⁾, T4 단독만으로 증상이 개선되지 않을 경우 T3와 T4을 함께 복용하는 것이 도움이 된다고 본다¹⁵⁾. 그러나 이러한 치료는 손상된 갑상선을 재생시키거나 근본적 면역기전을 회복시키는 것이 아니므로 대부분의 환자는 Levothyroxine을 평생 복용해야 하며, 일부에서는 호르몬보충요법으로 갑상선 호르몬 농도가 정상임에도 불구하고 증상이 지속되기도 한다¹⁶⁾.

갑상선기능이상증은 한의학적 한열개념에서의 한열의 불균형으로 진단될 수 있으며 한열의 균형조절이 치료원리가 될 수 있다. 갑상선기능저하증은 에너지 호르몬으로써 열에너지의 원천인 갑상선호르몬이 부족하여 나타나는 증상으로¹⁾ 한의학적 변증에서 陰陽 중에 陰症, 寒熱 중에 寒症에 해당한다고 진단할 수 있다. 1차성 갑상선기능저하증은 양기쇠소(陽氣衰少), 기불선통(氣不宣通)에 따른 결양증(結陽證), 명문화쇠(命門火衰)이나 습담조체(濕痰阻滯), 부종(浮腫) 등의 병증에 기인한 비신양허(脾腎陽虛)로 접근할 수 있고^{17,18)}, 치법(治法)으로는 온보신양(溫補腎陽), 보익심양(補益心陽), 온보비신(溫補脾腎), 보기보혈(補氣補血) 등이 있어 부자이중탕(附子理中湯), 사군자탕(四君子湯), 보중익기탕(補中益氣湯), 인삼탕(人蔘湯), 진무탕(眞武湯), 팔미환(八味丸), 당귀사역가오수유생강탕(當歸四逆加吳茱萸生薑湯) 등 다양한 처방이 활용되고 있다¹⁸⁻²⁰⁾. 또한 전신적 대사저하를 특징으로 하는 갑상선기능저하증은 ‘맥미세(脈微細), 단욕매(但欲寐)’ 상태의 상한(傷寒) 소음병(少陰病) 제강(提綱)에 부합되고, 상한(傷寒)

소음병(少陰病) 처방에 〈麻黃附子細辛湯麻黃附子甘草湯 附子湯 眞武湯 四逆湯 通脈四逆湯 白通湯〉 등이 있으며 이들 처방에 공통적으로 들어간 약재로 부자(附子)를 들 수 있다²¹⁾.

부자는 신농본초경(神農本草經)에 하품약으로 처음 수록되었으며 신감(辛甘), 대열(大熱), 유독(有毒)하고 심, 신, 비경에 귀경하여 상부(上部)에서는 심양(心陽)을 도와 통맥(通脈)하고, 중부(中部)에서는 비양(脾陽)을 온(溫)하게 하여 건운(健運)시키며, 하부(下部)에서는 신양(腎陽)을 보(補)하여 익화(益火)시킨다. 또한 외부(外部)로는 위양(衛陽)을 고(固)하여 거한(祛寒)하므로 온리(溫裏), 부양(扶陽), 거한(祛寒)의 요약(要藥)으로 진통, 강심, 회양의 목적으로 사용되며, 약용규격에 따라 생부편(生附片), 염부자(鹽附子), 흑순편(黑順片), 백부편(白附片), 담부편(淡附片), 포부편(炮附片) 등으로 구분하는데, 임상에서는 경포부자(京炮附子)라 하여 깨끗한 염부자(鹽附子)를 맑은 물에 담가서 염분을 제거한 후 감초(甘草)와 흑두(黑豆)를 함께 넣고 아린 맛이 없어질 때까지 물에 끓인 후 박편(薄片)으로 절단하여 건조시킨 담부편(淡附片)을 주로 사용하고 있다^{6,22)}. 부자의 잎(葉), 줄기(莖), 뿌리(根)에 유독성분으로 aconitin계 alkaloid 성분인 aconitine, mesaconitine, hyaconitine, jesaconitine이 있는데 이들은 열에 약하여 가수 분해되면 독성이 비교적 약한 benzoyl aconine으로 변화하고, 지속적인 가수 분해로 benzoyl aconine이 생성되면 독성이 거의 제거되는 것으로 알려져 있어 부자는 포제(炮製)하면 alkaloid 양과 독성이 대체로 감소된다¹⁰⁾. 부자의 현대 약리효능 연구는 주로 강심작용과 강심성분의 작용에 대한 것으로^{4,9)} 항부정맥 작용, 혈류량증가, 혈압상승 효과 및 신경계에 작용하여 항한랭, 진통 및 진정, 국소마취작용이 있으며, 항염과 면역기능 증강작용이 보고되었으며^{7,8)}, 일부 부자 복용 후 발생한 중독증 및 부작용에 대한 보고가 있다^{10,11)}.

한의학에서는 한약의 약물학적 성질을 음양에 입각해 寒, 熱, 溫, 涼의 四氣로 나누고 한열변증으로 진단하며, 약물의 한열온량 약성을 이용하여 한증과 열증에 적합하게 치료한다⁵⁾. 이에 대해 〈經史證類大觀本草〉에서는 “療寒以熱藥과 療熱以寒藥”이라 하여 한증을 치료하는데 열약을, 열증을 치료하는데는 한약을 사용함으로써 인체 온도변화를 조절한다고 하였고, 〈侶山堂油辯〉에서는 “春期溫 宜用涼 夏期熱 宜用寒 秋期涼 宜用溫 冬期寒 宜用熱”이라 하여 외부의 기온 때문에 인체의 온도변화가 있을 때 한열약으로 조절할 수 있다고 보았다. 또한 〈醫宗必讀〉에서도 “藥性之溫者, 於時爲春, 所以生萬物者也; 藥性之熱者, 於時爲夏, 所以長萬物者也; 藥性之涼者, 於時爲秋, 所以肅萬物者也; 藥性之寒者, 於時爲冬, 所以殺萬物者也... 溫熱之劑 均爲補虛 涼寒之劑 均爲寫實”이라고 하여 온열약은 기능을 보강하고 도와주며, 한량약은 기능을 억제하여 상호 균형을 조절한다고 하였다. 이처럼 약성의 사기는 한과 열의 두 가지 요소로 대별되어 체온과 밀접하게 연관되어 있으며 인체의 대사기능을 유지해 나가는 데 중요함을 알 수 있다⁵⁾. 따라서 본 연구에서는 한열개념에서 열성약에 해당되는 부자의 체온조절 기능을 통해 갑상선기능저하증에서의 병증이 개선될 수 있는지 확인해보고자 하였다. 특히 부자의 열성작용기전을 각각 높은 온도와 낮은 온도에서 활성화되는 말초 온도조절수용체(TRP)인 TRPV1과 TRPM8의 발현

변화를 측정함으로써 과학적 기전근거를 제시해 보고자 하였다. 현재 갑상선 기능저하증에 대한 본초의 현대약리 연구로는 인삼²³⁾, 시호²⁴⁾, 음양곽²⁵⁾, 육종용²⁶⁾, 부자¹⁰⁾, 오매²⁷⁾ 등에 대한 연구가 보고된 바 있지만 대부분 한열변증이론 적용이 아닌 갑상선기능저하증에 대한 개선효능 연구로 한열개념기반 체온조절 및 증상개선 연구는 본 연구진의 포부자추출물에 대한 연구에 의해 처음 보고되었다.

PTU는 갑상선에서 iodine과 tyrosine의 결합을 억제함으로써 TSH 분비를 증가시키고, T3, T4의 분비를 감소시켜 비활동성 갑상선 종대(simple goiter) 유발로 갑상선 기능을 억제하는 대표적 항갑상선제로 현재 갑상선기능저하증 동물모델제작에 많이 사용되고 있다²⁸⁾. 따라서 본 연구에서도 PTU의 경피주사방법으로 갑상선기능저하증이 유발된 흰쥐모델을 제작하였으며, 갑상선기능저하증 유발에 따른 체중의 전반적 감소, 체온감소, 혈당과 지질대사산물의 증가, 갑상선조직의 구조적 변형 및 혈액 내 TSH와 T4의 감소 등 전형적인 병적 특징을 관찰할 수 있었다^{10,18,19,24-28)}. 본 연구에서는 포부자추출물의 갑상선기능저하증 개선효능 비교를 위해 현재 치료제로 사용되는 Levothyroxine을 대조약물로 활용하였다²⁹⁾.

갑상선기능저하증의 대표적 증상은 갑상선호르몬 부족으로 갑상선호르몬의 필수 기능인 체내 에너지대사조절 실패로 체온이 조절되지 않아 추위를 잘 타게 되며 전반적으로 대사기능이 감소하게 된다. 본 연구에서 갑상선기능저하증이 유발된 흰쥐에 한열약인 부자추출물을 2주간 투여하였을 때 체온의 유의적 상승을 확인할 수 있었다. 이는 한열약인 부자가 체온 상승을 통해 갑상선기능저하증의 체온저하증을 개선시킬 수 있음을 의미한다. 한편, 갑상선기능저하증은 일반적으로 기초대사량의 감소로 체중 증가가 나타나지만, 실제 체중 증가가 나타나는 빈도는 54% 정도로 알려져 있고³⁰⁾, 오히려 28%의 환자는 체중 변화가 없으며, 나머지 13%의 환자는 오히려 식욕부진으로 체중이 감소한다고 알려져 있다³¹⁾. 따라서 체중증가는 갑상선기능저하증의 필수 증상으로 보기는 어려우며, 본 연구에서의 갑상선기능저하증 유발 흰쥐에서의 낮은 체중증가는 조직 내 당단백이 침착되는 것보다 식욕의 감소가 더 커서 나타난 결과로 추정되고, L-thyroxine 투여에 의한 체중증가는 L-thyroxine 대사의 이화작용을 촉진한 효과보다는 식욕 향진에 따른 섭취량 증가와 연관되어질 것으로 분석해볼 수 있다. 본 연구에서 포부자추출물은 갑상선기능향진증 유발에 따른 체중감소와 섭취량 및 음수량의 감소에는 영향을 주지 않았으나 지질항목의 증가에는 감소 효과가 있는 것으로 나타났다.

한편, 부자추출물의 갑상선 기능에 대한 효과를 평가하기 위해 TSH와 T4를 측정한 결과 직접적인 이들의 조절작용은 관찰되지 않았다. 반면 대조약물인 thyroxine은 TSH의 감소와 T4의 증가를 통해 호르몬을 조절하는 것으로 나타났다. 부자에 대한 갑상선기능저하증 연구로 고용량(500, 1000, 1500 mg/kg) 투여 시 TSH의 증가를 나타낸다는 보고가 있으며¹⁰⁾, 본 연구에서 포부자추출물의 저용량(300 mg/kg) 투여는 TSH, T4의 분비를 조절하지는 않지만 갑상선 조직의 병리적 변형을 개선시키고 체온조절과 함께 대사저하에 의한 지질항목의 증가를 감소시키는 것으로 나타나 향후 고용량 투여 시 호르몬 조절효과를 기대할 수 있을 것으로 사료된다.

PTU의 투여는 현저하게 갑상선 여포세포의 증생에 의한 비대와 여포 직경 및 여포 내 colloid 물질의 감소를 유발시키는 것으로 알려져 있다^{32,33}. 본 연구에서 PTU로 유발된 갑상선기능저하증 동물의 갑상선조직은 여포 직경의 감소, 여포 외벽에서의 여포세포의 수적 증가 및 이로 인한 외벽의 비후 및 여포 모양의 손상을 확인할 수 있었으며 이러한 조직학적 손상은 포부자추출물 투여에 의해 개선되어짐을 확인하였다. 이는 포부자추출물이 갑상선기능저하증 유발에 따른 갑상선 조직 손상을 감소시킴으로써 갑상선 호르몬 분비를 개선시킬 수 있음을 의미한다.

갑상선호르몬에 의한 체온조절은 말초조직에서 체온을 감지하는 일시적 온도 수용체 전위통로(transient receptor potential, TRP)에 의해 조절되며, TRP 통로가 활성화되면 양이온의 세포 내 유입(intracellular influx)을 통해 체온을 조절하게 된다. TRP 통로는 90년대 중반 초파리의 시각계에 존재하는 광수용체(photoreceptor)로 처음 발견되었으며³⁴, 이후 사람을 포함한 고등동물의 세포에도 존재함이 알려지면서 최근 다양한 분야에서 연구가 활발히 이루어지고 있다. TRPM8은 저온자극에 의해 활성화되기도 하고 멘톨(menthol)의 수용체 역할도 겸하는 일종의 저온 수용체 역할을 하는 TRP 통로로서 주로 체온보다 낮은 저온에서 활성화되는 것으로 알려져 있다³⁵. 반면 TRPV1은 열수용체이자 유해자극수용체(pungent receptor)이기도 하며 TRPV1 유전자를 제거한 마우스는 캡사이신(capsicin) 자극에 대해 거부반응이 나타나지 않고 통증을 유발하는 자극이나 열에 대한 반응도 현저히 저하되는 것으로 알려져 있다³⁰. 또한 TRPM8과 TRPV1의 발현은 동시에 증가 혹은 감소되는 경향이 나타나지 않아 TRPM8의 발현이 증가하면 TRPV1은 상대적으로 감소하며, TRPV1의 발현 증가는 TRPM8의 발현감소로 나타나게 되어 서로 상반된 경향을 나타내는 것으로 알려져 있다³⁶. 본 연구에서 포부자추출물은 척수후근신경절(DRG)과 뇌 조직에서 TRPV1의 발현을 증가시키고, TRPM8의 발현을 감소시킴으로써 체온을 조절하는 것으로 나타났다. 이는 PTU로 갑상선기능저하증을 유발한 동물모델에서의 낮아진 체온 변화를 포부자추출물의 투여로 상승시키면서 TRPV1과 TRPM8의 발현을 조절함으로써 갑상선기능저하증에 따른 체온 저하증을 개선시킴으로써 갑상선기능이상의 효과를 나타내는 것을 의미한다.

결론적으로 포부자추출물은 PTU로 갑상선기능저하증이 유도된 동물에서 감소된 체온을 상승시키고, 갑상선의 손상으로 인한 갑상선 호르몬 분비기능이상을 개선시키고, 갑상선기능저하증에 따르는 혈청 중의 지질대사산물의 이상을 개선시키는 것으로 나타났다. 이러한 기능장애는 갑상선저하증에 따르는 체온 저하로 인해 체내의 대사율 저하가 원인이 되는 것으로 보여지고, 이는 체온조절 수용체인 TRPM8과 TRPV1의 발현으로 확인할 수 있었다. 또한 포부자추출물이 이러한 체온조절 수용체의 발현조절을 통한 체온조절 상승과 더불어 저하된 대사율을 상승시킴으로써 갑상선기능저하증을 개선하는 것으로 생각된다. 더불어 이러한 근거를 바탕으로 갑상선기능저하증을 비롯한 대사율 저하로 인한 질병에는 열성을 띠는 약물을 사용한다면 보다 더 치료의 효율성을 높일 수 있을 것이라고 사료된다.

V. 결 론

본 연구에서는 PTU 투여로 갑상선기능저하증이 유발된 흰쥐모델에서 한열약인 포부자의 체온조절 및 개선효과를 확인하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 포부자추출물은 갑상선기능저하증에 따른 체중, 섭취량, 음수량의 감소에는 영향을 주지 않았다.
2. 포부자추출물은 갑상선기능저하증에 따른 체온저하를 증가시켰다.
3. 포부자추출물은 갑상선기능저하증에 따른 TSH, T4 호르몬 변화에 영향을 주지 않았다.
4. 포부자추출물은 갑상선기능저하증에 따른 혈액 내 GTP, glucose, LDL-cholesterol, total cholesterol의 증가를 감소시켰다.
5. 포부자추출물은 갑상선기능저하증에 따른 갑상선 조직의 구조적 손상을 억제하였다.
6. 포부자추출물은 척수후근신경절(DRG)과 뇌 조직에서의 TRPV1의 감소와 TRPM8의 증가를 통해 저체온을 상승시킬 수 있는 것으로 나타났다.

따라서 한열약인 포부자는 열성작용을 통해 갑상선기능저하증에서의 체온감소를 조절할 수 있는 것으로 나타났으며, 갑상선기능저하증에 의한 지질산물증가와 갑상선 조직의 구조적 손상을 감소시킬 수 있는 것으로 나타났다.

감사의 글

본 연구는 한국보건산업진흥원 “한의씨앗과제”의 연구비 지원을 받아 수행된 연구입니다(HI16C0622).

참고문헌

1. Doo HK, Oriental Medicine of Nephrology, Seoul : The Academy of oriental Medicine, 1993 : 729, 867-74, 1042, 1059-65.
2. Escobar-Morreale HF, Botella-Carretero JI, Morreale de Escobar G. Treatment of hypothyroidism with levothyroxine or a combination of levothyroxine plus L-triiodothyronine. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 2015 ; 29(1) : 57-75.
3. Cho BY, The clinical thyroidology, the 3rd editoin, Seoul : Korea Medicine, 2010 : 437-76.
4. Wiersinga WM. Thyroid hormone replacement therapy. Horm Res. 2001 ; 56 : 74-81.
5. Lee MY, Kim CS, Lee HG. Experimental study on

- the standardization of the Hot and the Cold Natures, Kor J Orient Med, 1996 ; 2(1) : 506-13.
6. The National College of Oriental Medicine Herbology Classroom, Herbology, Seoul : Youngrimsa, 2016 : 372-74.
 7. Kim HC, Oriental medicine pharmacology, Seoul : Jipmundang, 2001 : 372-4.
 8. Han JH, Kim KY, pharmacology of Oriental medicine, Seoul : Euseongdang, 2004 : 271-8.
 9. Hwangbo WH, Lee HS, Wu WS, Woo JR, Choi SC, Heo GD, Clinical Study of Acute Aconite Poisoning, Kor J Intern Med, 1982 ; 25 : 1223-8.
 10. Lee SH, Lee BC, Ahn YM, Doo HK, Ahn SY, The effects of Aconiti Radix on thyroid function in hypothyroidism rat model induced by 6-propyl-2-thiouracil(PRU), Korean J Orient Int Med, 2007 ; 28(2) : 275-83.
 11. Ra CS, Yoon UC, A Study on Bu-ja(附子), Oh-du(烏頭) Toxicosis, J Korean Med, 1995 ; 16(1) : 451-7.
 12. Jo BY, Clinical Thyroidology, Seoul : Korea Medical Book Publisher, 2001 : 231-55.
 13. Roberts CG, Ladenson PW, Hypothyroidism, Lancet, 2004 ; 363(9411) : 793-803.
 14. Reed Larsen P, Henry M, Kronenburg, Shlomo Melmed, Kenneth S, Polosky, Williams textbook of endocrinology, 10th edition, Saunders, 2003 : 333, 423-49.
 15. Roti E, Minelli R, Gardini E, Braverman LE, The use and misuse of thyroid hormone, Endocr Rev, 1993 ; 14(4) : 401-24.
 16. Clyde PW, Harari AE, Getka EJ, Shakir KM, Combined levothyroxine plus liothyronine compared with levothyroxine alone in primary hypothyroidism: a randomized controlled trial, JAMA, 2003 ; 290(22) : 2952-8.
 17. Ahn SY, Thyroid Clinic, Seoul : Seongbosa, 2004 : 210-3, 241-8.
 18. Doo HK, Study on the Kidney System of the Eastern Medicine, Seoul : Institute of Oriental Medicine, 1993 : 1059-65.
 19. Kim SI, Byun SH, Kang KH, Lee HC, Ahn YM, Doo HK, Ahn SY, The clinical efficacy of Anjunlizongtang for thyroid patients, J Int Kor Med, 2004 ; :65-72.
 20. Koo JS, Kim BH, Seo BI, A clinical study on a patient with hypothyroidism, Kor J Herbol, 2014 ; 29(5) : 17-21.
 21. Park HJ, The Introduction of sanghanron, Seoul : Yakupshinmunsa, 1995 : 184-216.
 22. Ahn DG, Kim HC, Study of Processing of Herbal Medicines, Seoul : Iljongsang, 1997 : 205-10.
 23. Kim SM, Effects of Ginseng Radix on the Rat Hypothyroidism Induced by PTU (6-n-propyl-2-thiouracil), Kor J Herbol, 2010 ; 25(3) : 11-8.
 24. Kim SM, Ku SK, Cho SY, Park SJ, Effects of Bupleuri Radix on the Rat Hypothyroidism induced by PTU(6-Propyl, 2-thiouracil), Kor J Orient Physiol Pathol, 2012 ; 26(5) : 714-23.
 25. Hong MJ, Lee BC, Ahn YM, Ahn SY, The Effects of Epimedii Herba on a Hypothyroidism Rat Model induced by PTU(6-Propyl, 2-thiouracil), J Pharmacopuncture, 2011 ; 14(4) : 13-22.
 26. Lee SJ, Baek SH, Ahn SY, Lee BC, Ahn YM, Effects of Cistanche Deserticola on Thyroid Function in Hypothyroidism Rat Model induced by PTU(6-Propyl, 2-thiouracil), Korean J Orient Physiol Pathol, 2011 ; 25(6) : 989-95.
 27. Choi JY, Roh SS, Park JH, Koo JS, Seo BI, Effects of Mume Fructus on the Rat Hypothyroidism Induced by PTU(6-n-propyl-2-thiouracil), Kor J Herbol, 2015 ; 30(4) : 109-19.
 28. Sarandöl E, Taş S, Dirican M, Serdar Z, Oxidative stress and serum paraoxonase activity in experimental hypothyroidism : effect of vitamin E supplementation, Cell Biochem Funct, 2005 ; 23 : 1-8.
 29. Choudhury S, Chainy GB, Mishro MM, Experimentally induced hypo- and hyper-thyroidism influence on the antioxidant defence system in adult rat testis, andrologia, 2003 ; 35 : 131-40.
 30. Zulewski H, Muller B, Exer P, Miserz AR, Staub JJ, Estimation of tissue hypothyroidism by a new clinical score: evaluation of patients with various grades of hypothyroidism and controls, J Clin Endocrinol Metab 1997 ; 82(3) : 771-6.
 31. Werner SC, Ingbar SH, The thyroid: a fundamental and clinical text, Hagerstown : Harper & Row, 1978 : 847.
 32. Hardie RC, Minke B, Novel Ca²⁺ channels underlying transduction in Drosophila photoreceptors: implications for phosphoinositide-mediated Ca²⁺ mobilization, Trends Neurosci, 1993 ; 16(9) : 371-6.
 33. O'Connor JC, Frame SR, Ladics GS, Evaluation of a 15-day screening assay using intact male rats for identifying steroid biosynthesis inhibitors and thyroid modulators, Toxicol Sci, 2002 ; 69 : 79-91.
 34. Oner J, Kukner A, Oner H, Ozan E, Yekeler H, Effect of vitamin E on follicular cell proliferation and expression of apoptosis-associated factors in rats with 6-N-propyl-2-thiouracil-induced goitrogenesis, Folia Histochem Cytobiol, 2003 ; 41 : 213-7.
 35. Takaishi M, Uchida K, Suzuki Y, Matsui H, Shimada T, Fujita F, Tominaga M, Reciprocal effects of capsaicin and menthol on thermosensation through regulated activities of TRPV1 and TRPM8, J Physiol Sci, 2016 ; 66(2) : 143-55.
 36. Pogatzki-Zahn EM, Shimizu I, Caterina M, Raja SN, Heat hyperalgesia after incision requires TRPV1 and is distinct from pure inflammatory pain, Pain, 2005 ; 115(3) : 296-307.